

*Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München*

*Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz*

**ZECKENZELLKULTUREN IN DER VIROLOGIE.
EIN GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK UND
EIGENE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ZÜCHTBARKEIT VON RNS- UND DNS-VIRUSARTEN**

*Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München*

von
Ulrike Settele
aus
Mering

München 1980

*Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München*

*Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz*

**ZECKENZELLKULTUREN IN DER VIROLOGIE.
EIN GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK UND
EIGENE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ZÜCHTBARKEIT VON RNS- UND DNS-VIRUSARTEN**

*Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München*

*von
Ulrike Settele
aus
Mering*

München 1980



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. E. Munz

Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 29. Februar 1980

Meiner Mutter

Seite

Einleitung

1. Die Geschichte meiner Mutter

Meiner Mutter

2. Die Kindheit meiner Mutter

3. Die Jugend meiner Mutter

4. Die Ehe meiner Mutter

5. Die Kinder meiner Mutter

6. Die Krankheit meiner Mutter

7. Die Sterbende meiner Mutter

8. Die Beerdigung meiner Mutter

9. Die Erinnerung an meine Mutter

10. Die Bedeutung meiner Mutter

11. Die Lehre meiner Mutter

12. Die Tugend meiner Mutter

13. Die Güte meiner Mutter

14. Die Güte meiner Mutter

15. Die Güte meiner Mutter

16. Die Güte meiner Mutter

17. Die Güte meiner Mutter

18. Die Güte meiner Mutter

19. Die Güte meiner Mutter

20. Die Güte meiner Mutter

21. Die Güte meiner Mutter

22. Die Güte meiner Mutter

23. Die Güte meiner Mutter

24. Die Güte meiner Mutter

25. Die Güte meiner Mutter

26. Die Güte meiner Mutter

27. Die Güte meiner Mutter

28. Die Güte meiner Mutter

29. Die Güte meiner Mutter

30. Die Güte meiner Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
1. Zur geschichtlichen Entwicklung der Zucht von Zeckengewebe	2
1.1. Allgemeines	2
1.2. Organtransplantate	2
1.3. Verwendung von Trypsin zur Herstellung von Einschichtzellkulturen	4
1.4. Subkulturen und Zelllinien	5
1.5. Bevorzugt verwendete Zeckenspezies, Organe und Entwicklungsstadien	8
1.6. Medien	10
2. Verwendung von Zeckenzellkulturen zur Viruszüchtung	12
3. Eigene Untersuchungen	18
3.1. Material und Methoden	18
3.1.1. Abkürzungen	18
3.1.2. Medien	18
3.1.3. Zellkulturen	19
3.1.3.1. Verozellen	19
3.1.3.2. BHK 13-Zellen	19
3.1.3.3. Sekundäre bzw. tertiäre Schafnierenzellen . .	19
3.1.3.4. Hühnerembryofibroblasten	20
3.1.3.5. Zeckenzelllinie TTC 243	20
3.1.3.6. Kulturgefäße	20
3.1.4. Virusstämme	21
3.1.5. Viruszüchtung in Warmblüterzellen	22
3.1.5.1. Titration der zur Infektion der Zelllinie TTC 243 verwendeten Virusstämme	23
3.1.6. Infektion der Zelllinie TTC 243	23

	Seite
3.1.7. Nairobi Sheep Disease-Viruspassagen in TTC 243-Zellen	24
3.1.8. Nachweis einer eventuellen Virusvermehrung in der Zelllinie TTC 243	24
3.2. Ergebnisse	26
3.2.1. Viruszüchtung in Warmblüterzellen	26
3.2.1.1. Viruszüchtung in Vero-Zellen	26
3.2.1.2. Viruszüchtung in FHE-Zellen	26
3.2.1.3. Viruszüchtung in BHK 13-Zellen	27
3.2.1.4. Viruszüchtung in Schafnierenzellen	27
3.2.2. Die unterschiedliche Eignung der Zecken- zelllinie TTC 243 zur Reproduktion der getesteten Virusarten	27
3.3. Diskussion	30
Zusammenfassung	36
Summary	
Literaturverzeichnis	38
Lebenslauf	

EINLEITUNG

Bedeutsame Viruserkrankungen bei Mensch und Tier werden durch Zecken als Vektoren übertragen. Diese sogenannten "tick-borne"-Virusinfektionen kommen bevorzugt in tropischen und subtropischen Ländern vor, doch auch in gemäßigten Klimazonen, so gewinnen sie z.B. in Zentraleuropa an Bedeutung.

Die Erforschung der "tick-borne"-Viren war bis vor wenigen Jahren praktisch ausschließlich auf den infizierten Wirt beschränkt und dabei auf die Verwendung von Versuchstieren, Bruteiern und Gewebekulturen aus Warmblüterzellen angewiesen. Untersuchungen über das Verhalten der Erreger in Vektorgewebe waren, im Gegensatz zu Arbeiten auf dem Gebiet der Protozoologie, kaum oder nur beschränkt durchführbar. Verbesserungen methodischer Art erhoffte man sich deshalb mit der Züchtbarkeit von Zeckengeweben. Ausgehend von Versuchen mit explantiertem Gewebe bzw. Organanteilen verschiedener Zeckenstadien stehen nunmehr Zeckenzelllinien im Mittelpunkt des Interesses. Sie bieten erhebliche Vorteile sowohl in produktions-technischer Hinsicht, als auch für die Bearbeitung vieler virologischer Probleme in der Arbovirusforschung.

In vorliegender Arbeit sollte einmal eine zusammenfassende geschichtliche Darstellung der Zeckenzellzüchtung und deren Verwendung für virologische Zwecke erstellt werden. In einem experimentellen Abschnitt galt es, die Empfänglichkeit der von Zecken der Gattung *Rhipicephalus appendiculatus* abstammenden permanenten Zelllinie TTC 243 für einige wichtige RNS- und DNS-Viren der Säugetiere zu testen, um damit schon länger am Institut laufende Untersuchungen ergänzend fortzuführen.

1. Zur geschichtlichen Entwicklung der Zucht von Zeckengewebe

1.1. Allgemeines

Die Haltung und die Zucht von Zeckengeweben in vitro ist an zwei elementare Voraussetzungen gebunden, nämlich an die Befreiung des Ausgangsmaterials von Begleitkeimen und an die Verwendung von geeigneten Nährmedien. Beides bereitete lange Jahre unüberwindliche Schwierigkeiten. Die Desinfektion der Zeckengewebe erfolgte mit Mitteln, die a priori toxisch für in vitro gehaltene Zellen sind und die deshalb wieder vollständig von den Geweben entfernt werden mußten. Bei den Nährmedien merkte man bald, daß die für die Zucht von Warmblüterzellen als brauchbar betrachteten Nährlösungen nicht geeignet waren. So wundert es nicht, daß erst ab 1958 über grundlegende Fortschritte bei der Zucht von Zeckengeweben berichtet wurde (REHAGEK, 1958). In Analogie zu den ersten Zuchtversuchen mit Säugetiergeweben versuchte man auch bei den Arthropodengewebekulturen zuerst über exstirpiertes Gewebe, das in Glaskolben transplantiert wurde, ein Zellwachstum zu erreichen.

1.2. Organtransplantate

Die ersten erfolgreichen Gewebsexplantate aus *Dermacentor marginatus* legte REHAGEK (1958) an, die er nach der Methode des "hängenden Tropfens" bei 25-28°C hielt. Er beobachtete ein fibroblastenähnliches Wachstum. MARTIN und VIDLER (1962) berichteten über die Herstellung von Organtransplantaten aus Nymphen und Adulten von *Rhipicephalus appendiculatus*. Die Autoren behandelten die verwendeten Zeckenstadien zur Desinfektion mit 70%igem Äthanol, fixierten sie dann in flüssigem Wachs, um schließlich aus den bewegungsunfähigen Tieren den Körperinhalt unter dem Präparationsmikroskop herauszupräparieren. Das in den Kulturgefäßen leicht angetrocknete und fixierte Gewebe wurde mit Kulturmedien überschichtet. Es kam zum Aussprossen morphologisch unterschiedlicher Zelltypen.

HOFFMANN, SCHEIN und JAGOW (1970) nahmen unterschiedlich vollgesogene Nymphen und adulte weibliche Zecken von Wirtstieren ab, desinfizierten sie in 70%igem Alkohol und seziierten sie. Das frisch präparierte Gewebe wurde mehrmals in steriler Insekten-Ringer-Lösung (nach Pringle) und Darmgewebe zusätzlich in 3,8%iger Natriumzitratlösung gewaschen. Die explantierten Organe wurden dann an die plane Fläche von alkalifreien Bellco-Röhrchen leicht angedrückt, mit 2 ml Nährlösung (Mischung aus Hanks'scher Salzlösung und der von den Autoren modifizierten Aminosäuren-Vitaminlösung nach Eagle überschichtet und bei 28°C inkubiert. Bei den explantierten Organen bzw. Organ- oder Gewebeteilen äußerte sich das Wachstum durch Aussprossen von Zellen. Es wird über eine unterschiedlich lange Überlebensdauer berichtet (s. 1.5).

Bei HOFFMANN und KÖHLER (1968) überlebten Ovarialtransplantate verschiedener Zeckenarten 82 Tage. REHACEK (1971) beobachtete, daß sich um das Ovarialgewebe aus Ixodes-Spezies und Dermacentor andersoni gut geformte epitheliale Zellen bildeten, die sich teilten. Die Zellen konnten bis 46 Tage am Leben erhalten und subkultiviert werden.

Im allgemeinen war jedoch die Lebendbeobachtung der Zellen nicht immer ideal, weil es - ausgehend von den Transplantaten - zu Überschichtungsvorgängen kam. Diese erschwerten u.a. auch die Beobachtung von evtl. infektionsbedingten zytopathischen Veränderungen. Wuchsen jedoch die Zellen um die Explantate gut aus, so bildete sich ein einschichtiger Zellrasen (Monolayer). Dieser konnte mit einem Gummischaber (sog. rubber policeman) vorsichtig abgelöst und suspendiert in neue Kulturgefäße übergeführt werden. Dort hafteten die Zellen bald auf ihrer Unterlage, begannen langsam zu wachsen und schließlich nach Wochen einen einschichtigen Zellrasen zu bilden.

Wird Gewebe von Zecken verschiedener Spezies (Vorimagostadium) mechanisch sehr fein zerteilt und in Medium aufgenommen, so lassen sich Hämozyten isoliert gewinnen. Diese setzen sich schnell an der Glaswand an und können über zwei Monate am Leben erhalten werden. Aus den bleibenden Zellfragmenten wachsen epithel- und fibroblastenähnliche Zellen und unter bestimmten, noch ungeklärten Bedingungen blasige, aus einer einzigen Schicht bestehende Zellvesikel von oft beachtlicher Größe. Diese vermehren sich weiter, bis sie nach einer gewissen Größe degenerieren. Sie lassen sich nicht über längere Zeit subkultivieren (REHACEK, 1971).

1.3. Verwendung von Trypsin zur Herstellung von Einschichtzellkulturen

In Anlehnung an die positiven Erfahrungen bei der Trypsinierung von Säugetiergewebe benutzte erstmals REHACEK (1965 a) Trypsin zur Herstellung von Primärzellen aus sich entwickelnden Adulten von *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor pictus* und *Hyalomma dromedarii*. Das trypsinierte Gewebe wurde in Röhrchen und Carrel-Flaschen ausgesät. Schon nach 3-5 Tagen kam es zur Zellrasenbildung. Zellmitosen waren noch 10 Tage nach der Zelleinsaat zu beobachten.

VARMA und WALLERS (1965) verwendeten einen Magnetrührer während der Trypsinierung. Die Autoren benutzten eine auf 37°C angewärmte 0,25%ige Trypsinlösung. Sie erhielten damit eine bessere Zellausbeute als REHACEK (1965 a).

Im Gegensatz dazu äußerten GURU und Mitarb. (1976), daß die Trypsinbehandlung zum weiteren Aufschluß von mechanisch zerkleinertem Gewebe einen negativen Einfluß ausübt. Sie befürworten deshalb eine besonders gründliche mechanische Zerkleinerung unter dem Mikroskop.

1.4. Subkulturen und Zelllinien

Bei der Überführung von in vitro gezüchteten Primärzellen von einem Kulturgefäß in ein neues erhält man Subkulturen. Läßt sich eine Zellpopulation mehrmals subkultivieren, so entsteht eine Zelllinie. Unter permanenten oder Dauerzelllinien versteht man Zellkulturen, die unbegrenzt subkultiviert werden können. Hierbei kommt es in der Regel zu Änderungen der Chromosomenausgangszahlen. Der große Vorteil von Zelllinien ist einmal die Unabhängigkeit vom Ausgangsmaterial, zum anderen ein homogener Zelltyp. Infektionsversuche werden damit durch diese konstant bleibenden Faktoren weniger beeinflusst als bei Primärkulturen.

MEDVEDEVA und Mitarb. (1972) subkultivierten embryonale Zellen von *Hyalomma asiaticum* 10 mal, VARMA und PUDNEY (1973) berichteten von 4maliger Subkultivierung von Zellen, die von sich entwickelnden *Rhipicephalus appendiculatus*-Zecken stammten, und von 20maliger Subkultivierung embryonaler Zellen von *Boophilus microplus*. Die Primärkulturen wurden aus zerriebenen Eiern, die zuvor mit "Roccal" desinfiziert worden waren, hergestellt. Sie enthielten Gewebeklümpchen, große, granulierte, fibroblastenähnliche Zellen und viele Zelltrümmer. Nach regelmäßigem Mediumwechsel wurden die Zelltrümmer jedoch eliminiert und dicht wachsende, deutlich runde oder abgeplattete, epithelähnliche Zellen überzogen den Boden der Kulturgefäße; es gab jedoch auch Zellen vom Fibroblastentyp. In diesem Stadium wurden die Zellen für Infektionsversuche verwendet. Die meisten Zellen hatten diploide Chromosomenzahlen: die männlichen 21, die weiblichen 22. Trotz beachtlicher Mitoseaktivität verlor man diese Linie (TTC 256) nach der 20. Passage. Die Subkulturen wurden in der Regel nicht durch Abtrypsinierung der Zellen angelegt, sondern man entfernte den Zellrasen mit Hilfe eines "rubber policeman" von der Glaswand, um sie dann vorsichtig mit einer Pipette zu dispergieren. REHACEK (1976) beschreibt die Herstellung von Subkulturen aus Eiern von *Dermacentor andersoni*, *D. pictus* und *D. marginatus*. Es gelangen allerdings nur 7-9 Zellpassagen.

Als erste berichteten VARMA, PUDNEY und LEAKE (1975) über die Herstellung von 3 Zelllinien aus sich entwickelnden erwachsenen *Rhipicephalus appendiculatus*-Zecken. Diese Zelllinien erhielten die Bezeichnungen TTC 219, TTC 243 und TTC 257. Als bestes Wachstumsmedium stellte sich das Medium L 15 von LEIBOVITZ mit 10% Tryptose-Phosphat-Bouillon und 10% inaktiviertem (30 min. bei 56°C) fötalem Kälberserum heraus. Während der frühen Wachstumsperiode beobachtete man große fibroblastenähnliche Zellen, die aus den am Boden haftenden Gewebeklümpchen herauswuchsen. In frischen Subkulturen erhielt man einen mehr oder weniger dichten einschichtigen Zellrasen mit epithelähnlichen Zellen, später neigten diese dazu, sich zusammenzuballen.

Diese Aggregate waren offensichtlich Zentren mitotischer Aktivität. Bei den ersten Passagen von TTC 243 hatten die Zellen den diploiden Chromosomensatz. Der Rest bestand aus fast gleich großen Mengen von Zellen mit Chromosomenzahlen unter oder über 21. Die Zelllinie TTC257 zeigte bei der 32. Passage unterschiedliche Chromosomenzahlen, meist 19. Die Zellen dieser Linie wuchsen nicht so dicht wie die der Linie TTC 243.

Charakteristisch für alle Zeckenzellprimärkulturen bzw. Subkulturen und Zelllinien ist eine im Vergleich zu Säugetierzellen wesentlich geringere Vermehrungsfähigkeit. So ließen sich die genannten Zelllinien anfangs nur im Verhältnis 2:3 subkultivieren. Erst in höheren Passagen konnten die Zelllinien TTC 243 und TTC 257 im Verhältnis 1:2 alle 1-2 Wochen passiert werden.

GURU und Mitarb. (1976) berichteten von Zelllinien, - die Zahl der Subkulturen zum Zeitpunkt der Veröffentlichung lag unter 10 - , die aus sich entwickelnden adulten Zeckengeweben (Umwandlungsstadien von Nymphen zu Adulten) gewonnen worden waren. Jeweils 2 Linien

stammten von *Haemaphysalis obesa* (ATC-304, ATC-311), *Haemaphysalis spinigera* (ATC-281/282, ATC-309) und *Rhipicephalus sanguineus* (ATC-307, ATC-308). Die Chromosomensätze dieser Zellen waren diploid und entsprachen jeweils den männlichen und weiblichen Zellen, nämlich 19 und 20 bei den *Haemaphysalis* Arten und 21 und 22 bei *Rhipicephalus sanguineus*. Als Medium verwendeten die Autoren Leibovitz L-15 Medium mit 10% Tryptose-Phosphat-Bouillon und 10% fötalem Kälberserum.

BHAT und YUNKER beschrieben 1977 eine Zelllinie (RML-14), die aus Embryonen der Zecke *Dermacentor parumapertus* hergestellt worden war. Diese Linie bildet einen Monolayer aus epithel- und fibroblastenähnlichen Zellen, die größtenteils diploid sind. Ihre Zahl verdoppelt sich innerhalb von 70 Stunden. Die Autoren verwendeten eine Mischung (2:1) aus Eagle's- und Leibovitz (L-15) Medium mit einem Zusatz von 20% fötalem Kälberserum, 10% Tryptose-Phosphat-Bouillon und 0,1% Rinderplasmaalbumin als Kulturmedium.

Die oben erwähnte Zelllinie TTC 243 von VARMA und Mitarb. (1975) findet deshalb in der Tropenveterinärmedizin besonderes Interesse, weil sie von der Zeckenspezies *Rhipicephalus appendiculatus*, der "braunen Ohrzecke" abstammt. *Rhipicephalus appendiculatus* ist ein wichtiger Überträger von Piroplasmen und Anaplasmen in vielen tropischen und subtropischen Ländern. In Ostafrika ist diese Zecke Hauptvektor und Reservoir für das Virus der Nairobi Sheep Disease, dem Erreger einer wirtschaftlich bedeutsamen Schaf- und Ziegenkrankheit.

Die Zecke gehört zu der Familie der Schildzecken (Ixodidae) und ist 3-wirtig. Ihr gesamter Entwicklungszyklus beträgt je nach Feuchtigkeit und Temperatur 61-202 Tage (ELBL und ANASTOS, 1966). *Rhipicephalus appendiculatus* schmarotzt an der Innenseite und am

Margus anterior des Ohres vor allem beim Schaf, aber auch bei Rind, Ziege, Pferd, Esel, Muli, Büffel und Antilope.

MONTGOMERY übertrug 1917 Nairobi Sheep Disease durch infizierte adulte Zecken auf empfängliche Tiere. Es war dies das erste Beispiel für eine "tick-borne"-Viruskrankheit.

DAUBNEY und HUDSON bewiesen 1931, daß die Krankheit auch durch Larven und Nymphen und sogar transovariell von Zeckenweibchen auf die Nachkommen übertragen werden kann. Damit war eine sog. vertikale Virusübertragung innerhalb einer Zeckengeneration nachgewiesen.

Die Infektion der Zecke erfolgt durch Aufnahme virushaltigen Blutes. Das Virus gelangt aus dem Darm der Zecke in die Speicheldrüse und vermehrt sich dort. Diese empirisch gewonnene Tatsache bedarf aber immer noch einer eingehenden pathogenetischen und morphologischen Verifizierung, die natürlich nur schwer zu erbringen ist.

Saugt eine infizierte Zecke an einem empfänglichen Wirt, so verliert sie ihre Infektiosität, sie "reinigt sich". Eine Reinfektion am gleichen Wirt ist möglich, sobald dieser ein virämisches Stadium entwickelt.

Bis vor kurzem konnte das Virus der Nairobi Sheep Disease nur in Säugetierzellen (bevorzugt in Schafnierenzellen und BHK 13-Zellen) und in Babymäusen gezüchtet werden. Erste Angaben über seine prinzipielle Vermehrbarkeit in der Zelllinie TTC 243 stammen von MUNDERLOH (1977).

1.5. Bevorzugt verwendete Zeckenspezies, Organe und Entwicklungsstadien

Die Vielzahl der getesteten Ausgangsmaterialien läßt erahnen, daß sich einer erfolgreichen Züchtung erhebliche Schwierigkeiten entgegenstellten, so daß man immer wieder andere Wege suchte. Im Vordergrund der Untersuchungen standen natürlich Zeckenspezies, die in der Natur häufig vorkommen und zugleich von medizinisch-biologischer Bedeutung sind. Neben adulten Zecken, meist kurz nach der Häutung, prüfte man sich umwandelnde Nymphen, Larven und Eier auf ihre Brauchbarkeit zur Zellzüchtung, letztere insbesondere in der Hoffnung, eine leichtere Aufschließung des Gewebes und damit a priori eine höhere Zellzahl zur Einsaat zu erhalten.

REHACEK (1958, 1965 a) begann mit Explantaten von *Dermacentor marginatus*, dann mit Trypsinierung von adulten *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor pictus* und *Hyalomma dromedarii*. Der Autor fand, daß anscheinend alle Entwicklungsstadien dieser Zeckenarten, unabhängig vom Geschlecht, geeignet sind, Zellen für Zellkulturen zu liefern. 1971 verwendete REHACEK nur Organe von erwachsenen Zecken dieser Arten und Gewebe von Nymphen oder von erwachsenen Zecken nach der Häutung. Die größte Ausbeute an Zellen ließ sich von Nymphen gewinnen, in denen das Imagostadium schon deutlich zu erkennen war. Bei YUNKER und CORY (1967) vermehrten sich Zellen aus präimaginalem Gewebe von *Dermacentor andersoni* 246 Tage lang. Sie begannen nach 263 Tagen zu degenerieren. Die gleichen Autoren beobachteten auch, daß *Dermacentor andersoni*-Nymphen in der Umwandlungsphase bei -11°C über viele Wochen gelagert werden können, ohne daß sie deshalb weniger lebensfähiges Gewebe lieferten als nicht eingefrorene Nymphen.

Es überlebten Speicheldrüsegewebe von Adulten der genannten Zeckenarten durchschnittlich 26-50 Tage, Darmgewebe 17-25 Tage, Ovarialgewebe 28-58 Tage, Gewebe Malpighischer Gefäße 13-17 Tage, sowie Hämozyten 6-8 Tage. Signifikante Unterschiede in der Überlebensdauer der Explantate von Adulten und Nymphen ergaben sich nicht.

MEDVEDEVA und Mitarb. (1972) verwendeten embryonale Zellen von *Hyalomma asiaticum*.

PUDNEY, VARMA und LEAKE (1973) stellten Subkulturen von Zellen her, die von sich entwickelnden erwachsenen *Rhipicephalus appendiculatus* und von embryonalen Zellen von *Boophilus microplus* stammten.

1.6. Medien

Die für die Kultivierung von Säugetierzellen üblichen Medien erwiesen sich als nicht brauchbar für die Haltung und Vermehrung von Zeckenzellen. Man versuchte deshalb Nährmedien, die sich aus Gemischen von Medien zur Zucht von Vertebratenzellen und aus Insektenzellkulturmedien und verschiedenen Zusätzen zusammensetzten.

REHACEK (1962, 1965 a) verwendete ein Medium, das sich aus der von Eagle für Vertebraten-Zellkulturen und der von VAGO und CHASTANG (1960) beschriebenen Nährflüssigkeit in einem Mischungsverhältnis von 1:1 zusammensetzte und dem 0,1% lyophilisiertes Kälberserum zugesetzt worden war. Letzteres kann durch 10% flüssiges fötales Kälberserum ersetzt werden (zit. bei REHACEK, 1971). Gute Ergebnisse sind weiterhin mit Hanks'scher gepufferter Salzlösung, der Aminosäuren und Vitamine von Eagle's Medium und 20% Rinderserum zugefügt wurden, erzielt worden (MARTIN und VIDLER, 1962). YUNKER und GORY (1967) verwendeten Lactalbumin-Hydrolysat in Hanks'scher Lösung mit Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem Kaninchenserum, 10% Hühnereiultrafiltrat und 10 mg Rinderserumalbumin pro ml Medium.

Entscheidende Verbesserungen der Medien wurden erzielt, nachdem die chemische Zusammensetzung und die physiologischen Werte der Zeckenhämolymph e weitgehend bekannt waren.

REHACEK und BRZOSTOWSKI (1969 a, b) schlossen aus den Grammprozenten der Kationen, daß die physiologischen Verhältnisse der Zeckenhämolymph e denen des Vertebratenplasmas sehr ähnlich sind (Na^+ mit 0,3, Mg^{2+} mit 0,003, Ca^{2+} mit 0,012 und K^+ mit 0,06). Diese Beobachtungen wurden durch die empirische Konzeption der vorangegangenen Kulturmedien für Zeckenzellkulturen bestätigt. Die Konzen-

tration der Aminosäuren liegt ebenfalls in der Größenordnung wie die in Medien für Vertebratenzellkulturen. Die gleichen Autoren (1969 b) stellten dabei fest, daß von den Zellen verschiedene Aminosäuren, wie Leucin, Methionin, Threonin, Phenylalanin, Prolin, Glutaminsäure und Asparaginsäure aufgenommen wurden, während die Konzentrationen anderer im Medium enthaltener Aminosäuren, so z.B. von Isoleucin, Valin, Arginin u.a., keine Änderung erfuhren. Als Zucker wurde dem Medium 0,5% Glukose und 0,04% Inosit zugegeben. Die Glukose wird zu über 43% innerhalb von 10 Tagen metabolisiert, während das Inosit nur zu 30% abgebaut wird. REHACEK und BRZOSTOWSKI (1969 a) hatten ein eigenes, für Zecken bestimmtes Kulturmedium auf der Grundlage von *Boophilus microplus*-Hämolymph e entwickelt und erfolgreich für Zellkulturen aus Zellen der Spezies *Rhipicephalus sanguineus* verwendet.

Nach PUDNEY, VARMA und LEAKE (1973) eignet sich zur Zucht der von ihnen entwickelten Zelllinien (vgl. Kap. 1.3.) am besten Leibovitz-Medium L 15 mit einem Zusatz von 10% Tryptose-Phosphat-Bouillon und 10% inaktiviertem (30 min. bei 56°C) fötalem Kälberserum. LEIBOVITZ (1963) hatte dieses vom CO₂-Bikarbonat-Puffer-System unabhängige Medium beschrieben. Es enthält einen basischen Argininpuffer und einen Überschuß an Aminosäuren. Als Zucker wird Galaktose statt Glukose verwendet.

Das von VARMA und PUDNEY (1973) entwickelte Medium "VP 12" war nur für die Zucht von *Rhipicephalus appendiculatus*-Gewebe geeignet, nicht dagegen für das Gewebe anderer Spezies. REHACEK (1976) bemerkt in diesem Zusammenhang, daß die erfolgreiche Zucht von Zeckenzellen nicht nur vom Medium, sondern in erster Linie von der benutzten Zeckenspezies abhängt.

2. Verwendung von Zeckenzellkulturen zur Viruszüchtung

Über die prinzipielle Eignung von in vitro gehaltenen Zeckengeweben zur Virusvermehrung berichteten als erste REHACEK und PESEK (1960). Die Autoren infizierten bei 25°C gehaltene Explantate, die aus Fettkörper, Hypodermis und anderen Organen von *Dermacentor pictus*, *Ixodes ricinus* und *Dermacentor marginatus* gewonnen worden waren, mit dem Virus der Östlichen Pferdeencephalitis. Nur in zusammenhängendem Gewebe und in Hypodermisexplantaten kam es zu einer geringen Virusvermehrung, nicht dagegen in Ovarien, Malpighischen Gefäßen und Speicheldrüsen. Die Virusvermehrung selbst wurde indirekt über die Infektion von Hühnerembryofibroblastenkulturen nachgewiesen, da keine zytopathischen Veränderungen auftraten.

Generelle Voraussetzung für eingehendere Untersuchungen zur Viruszüchtung war, daß genügend in vitro-Kulturen angelegt werden konnten, um überhaupt Virusmengen in quantitativ erfaßbaren Mengen zu erhalten. Stimulierend auf derartige Forschungen, die zu dieser Zeit nur in wenigen Laboratorien betrieben wurden, wirkte der Befund von REHACEK (1963), daß das Zeckenencephalitis-Virus sich sehr gut in Zeckenzellen vermehrte, ohne daß dies, wie sich erneut herausstellte, zu zellpathologischen Veränderungen führte.

REHACEK (1965 b, 1971) prüfte in der Folge in richtungsweisenden Untersuchungen Gewebekulturen von *Hyalomma dromedarii* auf ihre Empfänglichkeit gegenüber weiteren Virusarten. Die Kulturen wurden in Reagenzröhrchen angesetzt und ungefähr 24 Stunden nach der Aussaat, sobald die ersten Zellen auswuchsen, über das Medium infiziert. Zu verschiedenen Zeiten p.i. wurde infektiöses Material entnommen und in anderen empfänglichen Wirtssystemen auf Virusgehalt getestet. Dies war deshalb notwendig, weil sich generell zeigte, daß eine Virusvermehrung in Zeckenzellkulturen offensichtlich nicht mit einer sichtbaren Zellschädigung im Sinne eines zytopathischen

Effektes begleitet ist. Für den indirekten Nachweis der Virusmultiplikation verwendete REHACEK (1965 b, 1971) Mäuse und verschiedene Vertebratenzellkulturen.

Die Arboviren der Gruppe A, nämlich das Virus der Westlichen und der Östlichen Pferdeencephalitis, das Sindbis- und Semliki-Forest-Virus vermehrten sich gut, sogar fast gleich schnell (ca. $10^{0,5}$ - 10^1 log 10 pro Tag). Vertreter der Gruppe B verhielten sich unterschiedlich: Das Langat-, Japanische B-Encephalitis-, St. Louis-Encephalitis- und Gelbfieber-Virus vermehrten sich schlecht, das Virus der Kyasanur-Forest-Krankheit, das Powassan-, das Omsk'sche Hämorrhagische Fieber- und das West-Nile-Virus dagegen ziemlich gut. Das von Zecken Übertragene Russische Frühsommer-Encephalitis-Virus (westlicher Typ) und das Louping-ill-Virus vermehrten sich ausgezeichnet. Von besonderer Bedeutung war, daß die Züchtung von Viren, die nicht zu den Arboviren gehörten (z.B. das Encephalomyocarditis-, Poliomyelitis-, Vaccinia-, Vesiculäre Stomatitis-, Newcastle Disease- und Pseudowut-Virus), mit Ausnahme des Virus der lymphozytären Choriomeningitis, nicht gelang.

Die infizierten Kulturen wurden bei 27°C gehalten, weil die für Vertebratenzellkulturen optimalen Temperaturen für Zeckenzellen sich als zu hoch erwiesen hatten.

Prinzipiell zeigte sich, daß die Virusvermehrung in Zeckenzellkulturen im Vergleich zu der in Wirbeltierzellen langsamer abläuft. So wurden die höchsten Virustiter erst 8 Tage p.i. erreicht. Der Autor macht dafür die niedrigere Bebrütungstemperatur verantwortlich, er weist jedoch darauf hin, daß unterschiedliche Virusstämme bzw. -passagen bei den einzelnen Viruspezies andere Ergebnisse zeigen könnten. In vieler Hinsicht von praktischer Bedeutung war der Befund, daß die Eignung von Zeckenzellen für die Vermehrung bestimmter

Virusarten zu deren Klassifizierung mitverwendet werden kann und eine gegenüber Vertebratenzellen größere Empfänglichkeit der Zeckenzellen. REHACEK und KOZUCH (1964) hatten nämlich bei mit Zeckenencephalitis-Virus infizierten Primärkulturen von *Hyalomma dromedarii* beobachtet, daß eine Infektion mit wesentlich geringeren Virusdosen anging, als die für Hühnerembryofibroblasten notwendige Mindestdosis betrug.

REHACEK (1965 c) konnte erstmals die intrazytoplasmatische Vermehrung des Zeckenencephalitis-Virus in Zeckenzellen mit Hilfe der Immunofluoreszenz nachweisen. Dies bedeutete einen erheblichen Fortschritt für den Nachweis einer Virusvermehrung für diagnostische Zwecke.

Die hohe Empfänglichkeit von *Hyalomma dromedarii* Zellen benutzten REHACEK und KOZUCH (1969) zur Isolierung von Zeckenencephalitis-Virus aus Nagetierblut und Zecken. Von 187 getesteten Proben wurden 5 Virusstämme in den Zeckengeweben isoliert. Hierbei konstatierten allerdings die Autoren keine Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber den Viruswildstämmen zwischen der genannten Zeckenzellart, Hühnerembryofibroblasten und Saugmäusen. REHACEK (1976) glaubt, daß das Zeckenencephalitis-Virus in Zeckengewebekulturen ohne Virulenzänderung in Dauerpassagen gehalten werden kann. Er berichtet ferner über Doppelinfektionen von Zellkulturen von *Hyalomma dromedarii* mit dem Virus der Zeckenencephalitis und dem Kemerovo-Virus. Diese beiden Erreger hat man gleichzeitig in *Ixodes ricinus*-Zecken in der Slowakei nachgewiesen. Bei Simultaninfektionen der Zellkulturen kam es zu einer ausgeprägten Interferenz in der Vermehrung der Virusarten. Der Effekt ist anscheinend nicht interferonabhängig. Interferenz wurde nicht beobachtet, wenn die Kulturen im Abstand von 3-7 Tagen mit den beiden Erregern infiziert wurden.

YUNKER und GORY (1967) konnten Colorado-Zeckenencephalitis-Virus in Geweben aus Nymphen von *Dermacentor andersoni* zur Vermehrung bringen. Die Latenzperiode dauerte 6-10 Tage. Der Titeranstieg betrug nach 4-5 Wochen bei Inkubationstemperaturen von 26-28°C mehr als das 10⁴-fache. Bis zu 166 Tagen p.i. konnte in abnehmender Menge Virus nachgewiesen werden. Den Autoren gelang auch, aus natürlich infizierten Nymphen virusproduzierende Zellkulturen anzulegen.

Nach REHACEK (1976) hat man Hämocytenkulturen auch für virologische Untersuchungen herangezogen. Es gelang die Züchtung von Zeckenencephalitis- und Colorado Zeckenfieber-Virus. Eine breitere Anwendung fanden Hämocytenkulturen jedoch nicht, weil sie nur schwer in größerer Menge herstellbar sind und keine Vorteile gegenüber den üblichen Zeckenkulturen boten.

REHACEK und Mitarb. (1969) stellten fest, daß sich das Tribec-Virus in Kulturen aus *Hyalomma dromedarii* vermehrte. PUDNEY (1973) entdeckte, daß die folgenden vier, in der Natur von Zecken Übertragenen Virusarten in Primärkulturen von *Hyalomma dromedarii* ohne zytopathischen Effekt vermehrt werden können: Das Louping-ill-, Quaranfil-, Zirqa- und Lanjan-Virus. BANERJEE und Mitarb. (1977) verwendeten die von *Haemaphysalis spinigera* abstammende Zelllinie ATC 309 (GURU und Mitarb., 1976) zur Viruszüchtung. Die Autoren konnten das Moskito-Übertragene Japanische B-Encephalitis-, das West Nile-, das Chikungunya- und das Chandipura-Virus (ein Rhabdovirus) nicht in dieser Zelllinie zur Vermehrung bringen, wohl aber die durch Zecken Übertragenen Virusspezies Kyasanur-Forest-Disease, Ganjam, Bhanja, Kaisodi und Wad Medani. Das durch verschiedene Stechmücken Übertragene Sindbis-Virus vermehrte sich zwar, allerdings nur geringfügig. PUDNEY, VARMA und LEAKE (1978) berichteten jüngst eingehende Erfahrungen mit der Züchtung von 17 Arbovirustypen in der Zeckenzelllinie TTC 243 aus *Rhipicephalus appendiculatus* Zellen.

Neun der geprüften Virusarten konnten erfolgreich zur Vermehrung gebracht werden. Es waren drei, natürlicherweise durch Moskitos Übertragene Togaviren, nämlich das zum Genus Alphavirus gehörende Semliki-Forest-, das Whataroa- und das zum Genus Flavivirus gehörende West Nile-Virus. Dazu kamen sechs Erreger, die als natürliche Vektoren Zecken haben: Das Louping-ill-, Langat-, Quaranfil-, Zirqa-, Lanjan- und Keterah-Virus.

Diese Studie untermauerte die bahnbrechenden Arbeiten von REHACEK (1965 b). Sie zeigt, daß nicht nur Primärkulturen von Zeckenzellen, sondern besonders gut auch in davon abgeleiteten und etablierten Zelllinien Arboviren vermehrt werden können. Nach PUDNEY und Mitarb. (1978) traten dabei zwischen den Rhipicephalus appendiculatus-Zelllinien TTC 243 und TTC 257 weder gravierende Unterschiede im Zellwachstum, noch in den Vermehrungskurven der Viren auf, obwohl in zwei Versuchen die Titermaxima in der TTC 257-Zelllinie später erreicht wurden. Ebenso wenig waren Unterschiede in den Vermehrungskurven des Langat-Virus in Boophilus- bzw. in Rhipicephalus-Zellen feststellbar. Es zeigte sich ferner, daß Viren, die von Leder- und solche, die von Schildzecken übertragen werden, in Zellkulturen aus Schildzeckengewebe vermehrt werden können.

Nach HINK (1979) sollen sich das Kyasanur-Forest-, Ganjam-, Bhanja-, Kaisodi-, Wad Medani- und Sindbis-Virus in der Haemaphysalis spinigera-Zelllinie ATC 309, das Virus der Kyasanur-Forest-Krankheit auch in der Rhipicephalus sanguineus-Zelllinie ATC 307 vermehren.

Von LEAKE, PUDNEY und VARMA (1979) wurden die erwähnten Rhipicephalus appendiculatus-Zelllinien, die sich als die ersten permanenten erwiesen hatten, mit 28 verschiedenen Virusspezies infiziert, von denen sich 18 vermehren ließen. Im Gegensatz zur Moskito-Zelllinie LSTM AP 61, in der sich nur von Moskitos Übertragene Viren vermehren, gelang es, in den verwendeten Zelllinien die Replikation von folgenden, in der Natur von Zecken oder Moskitos übertragenen Viren, nachzuweisen:

- Die zum Genus Alphavirus gehörenden, durch Moskitos übertragenen Spezies Chikungunja, Getah, O'nyong-nyong, Semliki-Forest, Sindbis und Whatarhoa;
- die Flaviviren West Nile (von Moskitos übertragen), Langat und Louping-ill (beide von Zecken übertragen);
- aus der Familie Bunyaviridae das Bunyamwera-, das Dugbe- und Ganjam-Virus;
- die nicht klassifizierten und von Zecken übertragenen Virusarten, nämlich das Quaranfil-, Keterah-, Zirqa-, Punta Salinas-, Soldado- und Hughes-Virus.

Die Autoren hatten keinen Erfolg bei der Anzüchtung von Middleburg-Virus (ein durch Moskitos übertragenes Alphavirus). Ebenso wenig gelang die Kultivierung des Dengue 2-, Gelbfieber-Impfvirus 17D, sowie des Virus der Japanischen B-Enzephalitis (alles von Moskitos übertragene Flaviviren). Das der Familie Bunyaviridae zugehörnde Germiston-, Californische Zeckenencephalitis-, Tahyna- und Anopheles A-Virus konnten, wie die Rhabdoviren Chandipura und Piry, ebenfalls nicht zur Vermehrung gebracht werden. Die Autoren bemerkten, daß das Ausbleiben zytopathischer Effekte die Verwendung dieser Zelllinie für die Virusisolierung aus Feldmaterial einschränkt.

DAVID-WEST (1974) züchtete in der von PUDNEY und Mitarb. (1973) entwickelten Boophilus microplus-Zelllinie Dugbe-Virus. Er konnte auch eine etwa 40 Tage dauernde chronische Infektion nachweisen.

LEAKE und Mitarb. (1979) berichteten über eine latente Infektion der Rhipicephalus appendiculatus-Zelllinie TTC 243 mit Louping-ill-Virus. Am 28. Tag p.i. wurden die Zellen zum 1. Mal und dann 80 Wochen lang 1mal wöchentlich subkultiviert. Eine Viruspersistenz ließ sich über den gesamten Zeitraum nachweisen.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Abkürzungen

BHK 13	Zelllinie aus Baby-Hamster-Nierenzellen
FHE	Primäre und sekundäre Zellkulturen aus Hühner-embryofibroblasten
fKS	fötales Kälberserum
KID ₅₀	Kulturinfektiöse Dosis (50%)
LD ₅₀	Letaldosis (50%)
MEM	Minimal Essential Medium
TCM	Tissue Culture Medium
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Trypsin-Kochsalzlösung
RAF	Rinderamnionflüssigkeit
SchN	Sekundäre bzw. tertiäre Schafnierenzellen
TTC 243	Zelllinie aus Rhipicephalus appendiculatus-Zecken
TPB	Tryptose-Phosphat-Bouillon
zpe	zytopathischer Effekt

3.1.2. Medien

TCM 199⁺ mit einem Zusatz von 10% fKS, 1,68 g NaHCO₃/l und 24 ml/l Hepes-Puffer-Lösung (54 g Hepes (Fa. Serva) gelöst in einem Gemisch von 120 ml Aqua bidest und 80 ml einer 1-normalen NaOH-Lösung) diente zur Anzucht von Vero- und SchN-Zellen, bei letzteren und bei BHK 13-Zellen nach Anreicherung mit 10% fKS als Erhaltungsmedium.

MEM mit Hanks⁺ Salzen⁺ und 2% fKS war Erhaltungsmedium für Vero-Zellen. MEM nach Dulbecco mit einem Zusatz von 10% fKS und 10% TPB diente für die Züchtung von BHK 13-Zellen.

Leibovitz L-15 Medium⁺ mit einem Zusatz von 10% inaktiviertem (30 Minuten bei 56°C) fKS und 10% TPB war sowohl für die Züchtung als auch für die Erhaltung der Zeckenzelllinie TTC 243 gleichermaßen geeignet.

⁺Firma Seromed

Vor dem Gebrauch wurde das Medium auf ca. 25°C angewärmt. Lactalbumin-Yeast-Medium mit 10% fKS gebrauchten wir zur Herstellung der FHE-Kulturen, RAF für ihre Erhaltung.

Alle Medien enthielten Penicillin G-Natriumsalz, Dihydrostreptomycinsulfat sowie Phenolrot in der üblichen Dosierung und wurden durch Seitz EKS I-Schichten steril filtriert.

3.1.3. Zellkulturen

3.1.3.1. Verozellen

Nach Entfernung des Wachstumsmediums wurden dichte Zellrasen mit 0,25%iger PBST-Lösung überschichtet und diese 2 Minuten später wieder abgesaugt. Die Kulturen inkubierten dann ca. 15 Minuten bei 37°C. Danach ließen sich die Zellen mit Anzuchtmedium gut ablösen, resuspendieren und im Verhältnis 1:6 zur Ausgangsmenge subkultivieren. Sie wuchsen innerhalb von ca. 3 Tagen bei 37°C zu einem dichten Rasen aus. Bei dieser Temperatur wurden sie auch gehalten.

3.1.3.2. BKH 13-Zellen

Diese Zelllinie vermehrten wir ebenfalls im Verhältnis 1:6 auf oben beschriebene Weise. Die bei 37°C nach ungefähr 3 Tagen dichten Zellrasen konnten bei 28°C mindestens 14 Tage beobachtet werden.

3.1.3.3. Sekundäre bzw. tertiäre Schafnierenzellen

Ausgangsmaterial waren Primärkulturen aus frisch gewonnenen Nieren von Schlachttieren, die wir nach der üblichen Methode herstellten und deren Zellzahl auf 350000-400000/ml eingestellt war. Die nach etwa 4 Tagen dichten Zellrasen lösten wir, wie oben beschrieben, ab, suspendierten die Zellen einer Rouxschale in 15 ml DMSO-Lösung (60% Medium, 30% fKS und 10% Dimethylsulfoxid). In Portionen zu je 1 ml abgefüllt, lagerten die Zellen bei -80°C. Bei Bedarf nahmen

wir rasch aufgetaute Zellsuspensionen im Verhältnis 1:20 in Medium auf und bebrüteten dann bei 37°C. Die so angelegten Sekundärkulturen wuchsen in der Regel nach ca. 3-4 Tagen zu einem einschichtigen Zellrasen aus, der im Verhältnis 1:3 für Tertiärkulturen subkultiviert werden konnte.

3.1.3.4. Hühnerembryofibroblasten

Wir hielten uns für ihre Herstellung an die allgemein bekannte Technik. Die Zellzahlen wurden auf 500000/ml eingestellt. Die Bebrütungstemperatur betrug 37°C. Nach 3-4 Tagen wurde das Anzuchtmedium durch Erhaltungsmedium ersetzt.

3.1.3.5. Zeckenzelllinie TTC 243

Nach 8-10 Tagen hatte sich in der Regel ein dichter Zellrasen ausgebildet, der jedoch meistens nicht sehr fest am Boden der Kulturgefäße haftete. Diese mußten deshalb vorsichtig bewegt und behandelt werden. Zur Herstellung von Subkulturen entfernten wir das alte Medium behutsam. Mit einer Spritze resuspendierten wir die Zellen in frischem Medium im Verhältnis 1:2. Die Bebrütungstemperatur betrug 28°C. Bei Zimmertemperatur konnten dichte Zellrasen ungefähr 1 Monat aufbewahrt werden.

Die Kulturgefäße hatten wir vor Einfüllung der Zellsuspensionen "konditioniert". Zu diesem Zwecke wird der Boden der Kulturgefäße mit L-15 Medium für einige Tage überschichtet, im Brutschrank gelagert und das Medium unmittelbar vor Gebrauch wieder abgesaugt.

3.1.3.6. Kulturgefäße

Rouxschalen (Einfüllmenge 100 ml) dienten zur Anzucht von primären Schafnierenzellen. Davon hergestellte sekundäre und tertiäre Kulturen und die Zelllinien hielten wir in Plastikflaschen der Firma Falcon (15 ml für 25 cm² und 40 ml Einfüllmenge für 75 cm² Bodenfläche) und in Vierkantkolben nach Breed-Demeter (Einfüllmenge 20 ml).

Für Titrationsen in Zellkulturen verwendeten wir Leighton-Röhrchen der Firma Bellco oder Plastikkulturrohre der Firma Nunc.

3.1.4. Virusstämme

Folgende Virusstämme bildeten das Ausgangsmaterial für unsere Züchtungsversuche:

Ektromelie-Virus, Stamm Düsseldorf E2	10. 3T6-Passagen
Hühnerpocken-Virus, Stamm HP ₁	6. FHE-Passagen
Vaccinia-Virus, Stamm MVA	550. FHE-Passagen
Orf-Virus, Stamm D 1701	12. BEL-embryonale Rinderlungenzellen-Passagen
Allerton-Virus, Stamm Kiel/Hansen	9. ENK-embryonale Kälbernierenzellen-Passagen
Mamillitis-Virus, Stamm BMV-A	5. ERM-embryonale Rindermuskelzellen-Passagen
Aujeszky-Virus, Stamm Hannover II	7. FHE-Passagen
Infektiöse Bovine Rhinotracheitis-Virus, Stamm LA	4. ENK/2. BEL-Passagen
Bovine Adeno-Virus Typ 3, Stamm WBR I	2. ENK-Passagen
Polio-Virus Typ 1, Impfstamm Mahoney	12. Vero-Passagen
Sindbis-Virus, Stamm Tübingen	11. FHE-Passagen
Gelbfieber-Impfvirus, Vaccine Nr. 227/1/78 Robert-Koch-Institut Berlin	
Reo-Virus Typ 3, Stamm Dearing	6. Vero-Passagen
Nairobi Sheep Disease-Virus, Stamm O45	2. TTC 243-Passagen

⁺Für die Bereitstellung der Virusstämme Orf, HP1, Polio 1, Aujeszky, Sindbis und Infektiöse Bovine Rhinotracheitis danken wir Herrn Prof. Dr. Mahnel, Tierärztliche Fakultät der Universität München.

3.1.5. Viruszüchtung in Warmblüterzellen

Für die Vermehrung des Sindbis-, Ektromelie-, Hühnerpocken- und Aujeszky-Virus verwendeten wir in Vierkantkolben gezüchtete FHE-Zellen. Wir entfernten das Anzuchtmedium und gaben 9 ml RAF als Erhaltungsmedium und 1 ml Virusausgangsmaterial wieder dazu. Nicht adsorbiertes Virus wurde nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei 37°C durch Waschen mit Erhaltungsmedium entfernt, die Kolben mit 20 ml RAF beschickt und dann bei 37°C, mit Ausnahme der mit Ektromelie beimpften Kulturen, inkubiert. Hier erfolgte die Virusvermehrung bei 35°C.

Die Virusernte nahmen wir vor, sobald sich ein zpE von 90-100% entwickelt hatte. Dies war beim Sindbis-Virus nach 1-2, beim Aujeszky-Virus nach 3 Tagen p.i. der Fall. Hühnerpocken-Virus-infizierte Kulturen waren nach ca. 5 und Ektromelie-Virus beimpfte Zellen nach 4-6 Tagen zerstört.

Zur Vermehrung des Orf-, Bovinen Adeno-, Mamillitis- und Allerton-Virus auf SchN-Zellen, des Polio- und Reo-Virus auf Vero-Zellen und des Gelbfieber-Virus auf BHK 13-Zellen verfahren wir analog (Bebrütungstemperatur 37°C, beim Gelbfieber-Virus 28°C).

Die Virusernte war beim Polio-Virus nach 1, beim Orf-, Bovinen Adeno-Virus, Allerton- und Mamillitis-Virus nach 2-3, beim Reo-Virus nach 4 und beim Gelbfieber-Virus nach 8 Tagen.

Vorversuche zur Vermehrung des verwendeten Gelbfieber-Impfvirus hatten gezeigt, daß eine Vermehrung unter Ausbildung eines zpE in FHE-, Vero- und SchN-Zellen nicht stattfindet. Nur in BHK 13-Zellen und bei einer Bebrütungstemperatur von 28°C konnte das Ausgangsvirus gezüchtet und anhand eines zpE die KID₅₀ bestimmt werden.

Am Tag der Virusernte wurden die Kulturen bei -20°C eingefroren. Wir zentrifugierten sie nach raschem Auftauen bei 1000 g kurz ab und verwendeten die Überstände für die Titrationsen. Vaccinia- und Infektiöse Bovine Rhinotracheitis-Virus mit bekanntem Titer standen zur Verfügung.

3.1.5.1. Titration der zur Infektion der Zelllinie TTC 243 verwendeten Virusstämme

Die Titrationsen erfolgten für alle Stämme (mit Ausnahme des Nairobi Sheep Disease-Virus) in methodisch gleicher Weise. Das Virusmaterial wurde in 10er Potenzen verdünnt. Pro Verdünnungsstufe verwendeten wir 4 Röhrchen mit dichtem Rasen der jeweilig benötigten Zellart, in denen 1 ml Erhaltungsmedium vorgegeben war. Dazu gaben wir 1 ml der zu testenden Virusverdünnung. Die Bebrütungstemperaturen waren die gleichen, wie oben beschrieben. Die Titerberechnung erfolgte durch Auswertung des zpE nach der Methode von Kärber.

LD_{50} -Bestimmungen der Nairobi Sheep Disease-Viruspassagen und aus Vergleichsgründen auch der Gelbfieber-Viruspassagen führten wir in 1-3 Tage alten Saugmäusen (Stamm NMRI) der institutseigenen Zucht durch, wobei wir pro Verdünnung log 10 5 Mäuse einsetzten. Jedes Tier bekam 0,02 ml i.cer. injiziert. Die Beobachtungszeit betrug 14 Tage. Die LD_{50} -Dosis wurde ebenfalls nach Kärber errechnet.

3.1.6. Infektion der Zelllinie TTC 243

Alle Virusstämme (mit Ausnahme des Nairobi Sheep Disease-Virus, vgl. Kap. 3.1.7.) wurden in gleicher Dosierung (in der Regel 10^5 KID $_{50}$) auf jeweils 2, dicht mit TTC 243-Zellen bewachsene und 9 ml Medium enthaltende 25 cm² große Falconflaschen verimpft. Nach 3-stündiger Bebrütung bei 28°C saugten wir das Animpfmaterial vorsichtig ab und fügten 15 ml Medium zu. Ein Waschen des Zellrasens unterblieb (s. 3.1.3.5.). Jeweils am 2. und 4. Tag p.i. wurde der

Überstand äußerst vorsichtig abgesaugt und portionsweise bei -20°C eingefroren. Am 4. Tag p.i. wurde außerdem der Zellrasen separat in 15 ml frischem Medium geerntet und ebenfalls eingefroren. Zum späteren Nachweis einer Virusvermehrung standen somit jeweils 3 Proben zur Verfügung: Überstände des 2. und 4. Tages p.i. und die Zellphase des 4. Tages p.i..

3.1.7. Nairobi Sheep Disease-Viruspassagen in TTC 243-Zellen

Mit dem 4. Überstand (ca. 10^6 LD_{50}) der 2. TTC 243-Passage begannen wir unsere Serienpassagen in dieser Zelllinie in Anlehnung an die von MUNDERLOH (1977) beschriebene Methode. In der Folge gewannen wir jeweils am 2., 4., 7. und 9. Tag p.i. die Überstände (die Zellphasen wurden verworfen) und froren sie bei -80°C ein. Mit jeweils 2 ml des 4. Überstandes (entsprechend $2 \times 10^5 \text{ LD}_{50}$) setzten wir eine neue Passage an. Nach Entfernung des Mediums gaben wir den Kulturen 8 ml frisches Medium und 2 ml infektiösen Überstand der vorhergehenden Passage zu. Das Animpfmaterial wurde 3 Stunden p.i. entfernt und durch 15 ml frisches Medium ersetzt.

3.1.8. Nachweis einer eventuellen Virusvermehrung in der Zelllinie TTC 243

Die mit den verschiedenen Virusstämmen infizierten Zeckenzellen wurden täglich auf das Auftreten eines zpE kontrolliert. Um eine eventuell stattgefundene Virusvermehrung in den abgenommenen Proben nachzuweisen, titrierten wir die zellfreien Überstände ohne weitere Vorbehandlung wie oben beschrieben. Die Zellphasen wurden zuvor 3mal eingefroren und wieder aufgetaut und bei 1000 g kurz abzentrifugiert. Wir führten den Virusnachweis jeweils in dem Zellsystem, in dem der jeweilige Virusstamm ursprünglich vermehrt worden war.

Das Nairobi Sheep Disease-Virus (ausschließlich die Überstände) titrierten wir durch intracerebrale Verimpfung auf Babymäuse (vgl. 3.1.5.1.).

Darüberhinaus wurden je ein etwa 10 Monate altes weibliches Merinoschaf mit der 6. TTC 243-Passage (vereinigter 1. und 2. Überstand, 8 ml i.v. und 6 ml s.c., zusammen $10^{3,5}$ LD₅₀), bzw. der 26. (vereinigter 1. und 2. Überstand, davon 43 ml s.c. und 15 ml i.v., entsprechend $1,5 \times 10^7$ LD₅₀) infiziert. Wir hielten die Schafe in einem Isolierstall unter strengen hygienischen Bedingungen. Täglich wurde der Hämoglobingehalt bestimmt, das Blutbild kontrolliert und die Temperatur gemessen. Um eine eventuelle Virämie nachzuweisen, verimpften wir frisch gewonnenes Serum i.cer. auf Babymäuse nach üblicher Technik. Die Schafe wurden 13 Tage p.i. getötet und pathologisch-anatomisch untersucht.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Viruszüchtung in Warmblüterzellen

3.2.1.1. Viruszüchtung in Vero-Zellen

Die Infektion mit Reo-Virus zeigte schon am 1. Tag p.i. einen zpE. Er äußerte sich in Form von vergrößerten, abgerundeten, stärker lichtbrechenden und in Gruppen befindlichen Zellen. Etwa am 4. Tag p.i. war die Zerstörung des Zellrasens vollständig. Der Titer der Virussuspension betrug $10^{7,75}$ KID₅₀/ml.

Beim Polio-Virus trat durchschnittlich schon am 1. Tag p.i. ein 100% generalisierter Effekt auf. Die Zellen waren abgekugelt, viele auch gequollen, granuliert, stärker lichtbrechend und sie lösten sich ab. Wir bestimmten den Virusgehalt auf 10^8 KID₅₀/ml.

Das Allerton- und Mammillitis-Virus verursachten schon am 1. Tag p.i. einen zpE, der ca. am 3. Tag p.i. generalisiert war. Die Zellgrenzen zerflossen, tropfenartige, granuliert, stärker lichtbrechende Riesenzellen waren häufig (Synzytiumbildung) und für eine Herpesinfektion typisch. Der Titer betrug bei Allerton-Virus-infizierten Kulturen $10^{4,25}$ KID₅₀/ml und beim Mammillitis-Virus 10^5 KID₅₀/ml.

3.2.1.2. Viruszüchtung in FHE-Zellen

Bei den mit dem Hühnerpocken-Virus infizierten Zellrasen quollen am 2. Tag p.i. die Zellen auf und wurden polygonal. Etwa am 5.-6. Tag p.i. traten zu 80% flächenhafte, bläschenförmige, granuliert Zellen auf. Der Titer betrug $10^{5,75}$ KID₅₀/ml.

Beim Sindbis-Virus trat ungefähr 1-2 Tage p.i. ein generalisierter zpE in Form von abgerundeten und abgelösten Zellen auf. Der Titer lag bei $10^{4,25}$ KID₅₀/ml.

Das Ektromelie-Virus verursachte am 1. Tag p.i. eine Abrundung, Granulierung und Quellung der Zellen. Ungefähr am 5. Tag p.i. war der Effekt 100%ig. Der Titer wurde mit $10^{7,75}$ KID₅₀/ml errechnet.

Die Infektion mit Aujeszky-Virus ließ am 1. Tag p.i. eine beginnende typische Riesenzellbildung erkennen, am 2. Tag p.i. war diese generalisiert ausgeprägt. Der Titer betrug $10^{7,5}$ KID₅₀/ml.

3.2.1.3. Viruszüchtung in BHK 13-Zellen

Etwa am 4. Tag nach der Beimpfung mit Gelbfieber-Virus begannen die Zellen sich abzurunden und zu quellen. Erst am 8.-9.Tag p.i. waren 90% der Zellen abgerundet, gequollen und der ganze Rasen stark granuliert. Der Titer war 10^7 KID₅₀/ml, in Saugmäusen wiesen wir eine LD₅₀ von $5 \times 10^{6,25}$ /ml nach.

3.2.1.4. Viruszüchtung in Schafnierzellen

Die Infektion mit Orf-Virus zeigte bereits nach einem Tag einen zpE. Er äußerte sich in Form von abgerundeten, gequollenen, stärker lichtbrechenden Zellen, die in Haufen beieinander lagen. Am 2. Tag p.i. war der Effekt generalisiert. Der Titer betrug 10^7 KID₅₀/ml.

Das Bovine Adeno-Virus verursachte am 1. Tag p.i. einen Effekt in Form von abgerundeten, gequollenen und granulierten Zellen. Am 2. Tag p.i. traten diese generalisiert auf. Der Titer lag bei $10^{7,5}$ KID₅₀/ml.

Beim Vaccinia- und Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis-Virus war der Titer bereits bekannt. Er betrug bei beiden Virusstämmen $10^{7,25}$ KID₅₀/ml.

3.2.2. Die unterschiedliche Eignung der Zeckenzelllinie TTC 243 zur Reproduktion der getesteten Virusarten

Die Infektion der Zelllinie mit Vaccinia-, Hühnerpocken-, Ektromelie-, Orf-, Sindbis-, Gelbfieber-, Aujeszky-, Infektiösem Bovinen Rhinotracheitis-, Allerton-, Mammillitis-, Bovinem Adeno-, Polio- und Reo-

Virus ließ keinen zpE erkennen. Bis zum 4. Tag p.i., an dem wir in der Regel den 2. Überstand abnahmen und die Zellphase gewannen, waren die Kulturen in einwandfreiem und gegenüber den Kontrollen unverändertem Zustand. Bei den mit Nairobi Sheep Disease-Virus infizierten TTC 243-Zellen kam es dagegen im Verlauf der längeren Beobachtungszeit (bis zum 9. Tag p.i.) zu einer unspezifischen Zellschädigung, denn die gleichen Erscheinungen wurden in den Kontrollen beobachtet.

Die Versuche zur Isolierung von Virus aus infizierten TTC 243-Zellen bestätigten bis auf zwei Ausnahmen, daß es zu einer echten Virusreproduktion nicht gekommen war. Es gelang nämlich nicht, eine eindeutige Vermehrung von Vaccinia-, Hühnerpocken-, Ektromelie-, Orf-, Gelbfieber-, Aujeszky-, Infektiösem Bovinen Rhinotracheitis-, Allerton-, Mammillitis-, Bovinem Adeno-, Polio- und Reo-Virus nachzuweisen. Die Ergebnisse der Titrationsen der 1. Überstände zeigten nur in den schwächsten Verdünnungen noch einen sehr geringen Virusgehalt an. Er lag beim Orf-, Ektromelie-, Infektiösem Bovinen Rhinotracheitis-, Bovinem Adeno-, Polio- und Reo-Virus bei 10^1 KID₅₀/ml, beim Allerton- und Mammillitis-Virus bei 10^2 KID₅₀/ml.

In den 2. Überständen der mit Mammillitis-, Infektiösem Bovinen Rhinotracheitis-, Polio- und Reo-Virus infizierten Zeckenzellen betrug der Virusgehalt ebenfalls noch 10^1 KID₅₀/ml. Beim Orf-, Ektromelie-, Hühnerpocken-, Allerton- und Polio-Virus ließ sich auch in der Zellphase ein geringer Virusgehalt von 10^1 KID₅₀/ml nachweisen.

Im Gegensatz dazu konnten wir beim Sindbis-Virus nach Rückverimpfung auf FHE-Zellen einen Virusgehalt der Zeckenzellphase von 10^4 KID₅₀/ml errechnen, während die Überstände überraschenderweise keinen Virusgehalt aufwiesen. Unter Berücksichtigung der Animpfdosis läßt sich für die Zellphase eine Virusvermehrung um das 10-fache konstatieren.

Das Nairobi Sheep Disease-Virus vermehrte sich in der TTC 243-Zelllinie dagegen gut. Hier betrug der Virusgehalt der jeweils 4. Überstände durchschnittlich 5×10^5 LD₅₀/ml. Wir ernteten pro Passage 60 ml

virushaltiges Medium, das im Durchschnitt einen Titer von 10^5 LD₅₀/ml hatte. Der Gesamtvirusgehalt einer Passage betrug demnach ca. 6×10^6 LD₅₀/ml. Wir führten insgesamt 32 Passagen durch (3.-34.). Der 4. Überstand der 34. Passage enthielt $5 \times 10^{5,1}$ LD₅₀/ml. Das Gesamtvolumen der geernteten Überstände betrug 32×60 ml, also 1920 ml mit einem Gesamtvirusgehalt von $1,92 \times 10^8$ LD₅₀/ml. Gegenüber der Ausgangsinfektionsdosis konnte somit eine Vermehrungsrate von mindestens 1:100 erzielt werden.

Eine Änderung der Virulenz für die Babymäuse war dabei nicht zu beobachten. Die Inkubationszeit betrug unverändert 5-6 Tage.

Das Allgemeinbefinden von Schaf A, das mit Material der 6. TTC-Passage infiziert worden war, blieb ungestört, obwohl am 3. Tag p.i. die Temperatur auf $40,5^\circ\text{C}$ und am 6. Tag p.i. auf $41,2^\circ\text{C}$ gestiegen war. Das Blutbild dieses Schafes veränderte sich während der Beobachtungszeit nicht signifikant, sieht man von nicht pathologischen Schwankungen der Leukozytenzahlen während des ganzen Beobachtungszeitraumes ab. So blieben der Hb-Gehalt, die Zahl der Erythrozyten und das HbE praktisch auf den Werten des Infektionstages.

Schaf B, das Virusmaterial der 26. TTC-Passage erhalten hatte, zeigte keine Störungen des Allgemeinbefindens. Am 2. Tag p.i. erreichte die Temperaturkurve ein Maximum von $40,1^\circ\text{C}$, am 5. Tag p.i. $39,9^\circ\text{C}$. Die Untersuchung des Blutes ließ bei keinem der oben erwähnten Parameter bemerkenswerte Abweichungen von der Norm erkennen, nur die Zahl der Leukozyten stieg am 6. Tag p.i. an, um am 8. Tag p.i. einen Höhepunkt mit 9700 zu erreichen. Diese Zahl fiel bis zum 11. Tag p.i. auf den Ausgangswert von ca. 4600 wieder ab. Weitere Besonderheiten im weißen Blutbild konnten nicht beobachtet werden.

Beide Schafe wurden am 13. Tag p.i. getötet und seziiert. Pathologische Veränderungen konnten nicht festgestellt werden. Im Serum der Schafe A und B konnte nach Verimpfung auf infantile Mäuse kein Virus nachgewiesen werden.

3.3. Diskussion

Der Literaturteil der Arbeit enthält einen geschichtlichen Überblick über die Entwicklung und den derzeitigen Stand der Herstellung von Zeckenzellkulturen und deren Verwendbarkeit für die Züchtung von bestimmten Virusarten. Danach gelang es erst in neuester Zeit, Zeckenzellkulturen mit Aussicht auf Erfolg anzulegen. Die dagegen im Wege stehenden größten Schwierigkeiten bestanden in der Beseitigung bakterieller Begleitkeime ohne Schädigung des Zellausgangsmaterials und der Herstellung geeigneter Medien.

Die ersten Berichte über die Entwicklung einer Zeckenzelllinie stammen aus dem Jahre 1975 (VARMA, PUDNEY und LEAKE). Nur wenige weitere Zelllinien hat man bisher gewinnen können. Trotz dieser Anfangserfolge ist aber auch heute noch die Züchtung von Zeckenzellen bzw. Zeckenzelllinien auf wenige Institute beschränkt.

Von diesem neuen Wirtssystem erhoffte sich vor allem die Arbovirusforschung neue Impulse. In erster Linie war man in Europa an der Züchtung des humanpathogenen, durch Zecken übertragenen Frühsommermeningoencephalitis-Virus, dann aber auch an allen anderen Arboviren interessiert. Seit der Möglichkeit des Einsatzes von Zeckenzelllinien überprüfte man, inwieweit diese generell zur Isolierung und quantitativen Vermehrung von Virusarten der Warmblüter geeignet sind. Die eingehendsten Untersuchungen darüber stammen von PUDNEY und Mitarb. (1978) und von LEAKE und Mitarb. (1979). Danach vermehrt sich in der *Boophilus microplus* TTC 256- bzw. in den *Rhipicephalus appendiculatus*-Zelllinien TTC 243 bzw. TTC 257 ein breites Spektrum von Arboviren, erwartungsgemäß alle sog. "tick-borne"-Virusarten, die getestet wurden. Hierbei zeigten sich allerdings erhebliche Unterschiede in der Vermehrungsrate und -art der verschiedenen Virusspezies. Hohe Werte wurden teilweise schon nach 1-2 Tagen p.i., die Titergipfel in der Regel um den 6. Tag p.i. erhalten. Der Virusgehalt nahm über 3 Wochen

im allgemeinen nur langsam wieder ab. Dabei war der Anteil von zellfreiem Virus meist größer als der des zellgebundenen.

LEAKE und Mitarb. (1979) beobachteten auch eine persistierende Infektion in der Zeckenzelllinie TTC 243 nach Beimpfung mit dem Louping-ill-Virus. Die Autoren konnten noch nach 90, wöchentlich durchgeführten Subkulturen Virus nachweisen. Offensichtlich kam es dabei nicht zu einer Änderung der Virusqualität, weil es nach Rückverimpfung auf Warmblüterzellen zu keiner Abweichung der Plaquemorphologie gekommen war.

DAVID-WEST (1974) hatte in der Boophilus microplus-Zelllinie eine chronische Infektion mit Dugbe-Virus nachweisen können.

Übereinstimmend teilen alle Untersucher mit, daß eine Virusvermehrung ohne zpE abläuft. Sie muß deshalb indirekt über ein anderes Wirtssystem nachgewiesen werden. Hierzu verwendete man in der Regel Warmblüterzellen, Hühnerembryonen und Babymäuse. Die Autoren bemerken, daß das Ausbleiben eines zpE bei beimpften Zeckenzellkulturen ihre erhoffte Verwendbarkeit bei der Anzüchtung von Feldisolaten einschränkt.

In unseren Untersuchungen überprüften wir, ob das Vaccinia-, Hühnerpocken-, Ektromelie-, Orf-, Gelbfieber-, Aujeszky-, Infektiöse Bovine Rhinotracheitis-, Allerton-, Mammillitis-, Bovine Adeno-, Polio- und Reo-Virus in der Zeckenzelllinie TTC 243 vermehrt werden kann. Wir haben bewußt überwiegend nicht zu den Arboviren zählende Erreger ausgewählt, um zur Klärung der Frage, inwieweit Zecken eventuell auch solche Virusarten übertragen können, beizutragen. Im Rahmen von am Institut laufenden Arbeiten zur Biologie des in der Natur von Zecken übertragenen Nairobi Sheep Disease-Virus sollte aber gerade auch dieser Erreger, um erste positive im Institut erzielte Ergebnisse zu bestätigen, in die Untersuchungen miteinbezogen werden. Darüberhinaus prüften wir das Verhalten des durch Moskitos übertragenen Sindbis-Virus.

Die genannten Virusarten waren auf herkömmliche Weise in Zellkulturen gezüchtet worden, wobei wir das Hühnerpocken-, Ektromelie-, Sindbis- und Ajeszky-Virus in Hühnerembryofibroblasten, das Polio- und Reo-Virus in Vero-Zellen, das Gelbfieber-Virus in BHK 13-Zellen, das Orf-, Bovine Adeno-, Mamillitis- und Allerton-Virus in Schafnierenzellen vermehrt hatten.

Die Haltung der Zeckenzelllinie TTC 243 war nicht unproblematisch und erforderte im Vergleich zu den anderen Zellarten einen weit größeren Aufwand und viel mehr Sorgfalt in der Behandlung der Zellen. Eine entscheidende Bedeutung für die erfolgreiche Züchtung dieser Zeckenzelllinie kommt dabei nach unseren Erfahrungen der Art der verwendeten Kulturgefäße zu. Die für die Kultivierung von Warmblüterzellen üblicherweise verwendeten alkalifreien Glasgefäße eigneten sich nicht. Die besten Züchtungsergebnisse hatten wir mit Plastikflaschen, weniger gute mit alten, nicht säurebehandelten Arzneimittelflaschen. Es kam aber immer wieder vor, daß auch in den Plastikflaschen die Zellen nicht regelmäßig auswuchsen bzw. gar nicht hafteten. Wir vermuten dafür als Ursache nicht erkennbare, fabrikationsbedingte Qualitätsunterschiede, da Einflüsse von seiten des Mediums bzw. des Serums ausgeschlossen werden konnten. Es erwies sich ferner als vorteilhaft, die Kulturgefäße vor der Zelleinsaat einige Tage mit Medium überschichtet stehen zu lassen (sog. Konditionieren).

Zur Infektion der Zeckenzellen verwendeten wir jeweils gleiche Virusmengen (10^5 KID₅₀).

In dem am 2. und 4. Tag p.i. abgenommenen Medium und in der am 4. Tag geernteten Zellphase ließen sich nur geringe Mengen der zur Anzucht verwendeten Virusstämme mit Ausnahme der positiven Befunde bei Sindbis- und Nairobi Sheep Disease-Virus (s.u.) nachweisen. Wir glauben, daß es sich dabei um Restvirus aus dem Animpfmateriail handelt, das 3 Stunden p.i. mit dem Mediumwechsel nicht restlos entfernt werden konnte und nicht um neugebildetes Virus. Eine echte Virusvermehrung fand demnach nicht statt. Damit werden die Befunde von REHACEK (1972) bestätigt, der Vaccinia-, Polio-, Ajeszky- und

Gelbfieber-Virus in Primärkulturen von *Hyalomma dromedarii* ebenfalls nicht vermehren konnte. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß in der Natur Zecken als Reservoir für die getesteten Viren in Frage kommen.

Nach MUSSGAY und Mitarb. (1975) ermöglicht eine Arthropodenzelllinie im allgemeinen nur dann eine Vermehrung eines Arbovirus, wenn auch in der Natur entsprechende Wechselbeziehungen zwischen Vektor und Erreger bestehen. Wir konnten dagegen wie bereits RHACEK (1972) - allerdings in *Hyalomma dromedarii* Zellen - und BANERJEE und Mitarb. (1977) - in der *Haemaphysalis spinigera*-Zelllinie ATC 309 - eine Vermehrung des in der Natur durch Stechmücken übertragenen Sindbis-Virus in der Zeckenzelllinie TTC 243 feststellen. Hierbei fanden wir eine anscheinend ausschließlich zellgebundene Virusreplikation. Die Zellphase hatte einen Titer von $1,5 \times 10^{5,25}$ KID₅₀/ml, der volumemäßig gleiche 1. und 2. Überstand erwies sich als praktisch virusfrei. Eine Erklärung für diese Ausnahmen von der ansonsten weitgehend gültigen, oben zitierten Regel können wir nicht geben, sie liegen anscheinend in der Natur der Zeckenspezies begründet, die zur Kultur verwendet wird (BANERJEE und Mitarb., 1977). Weitere Beweise für eine überwiegend zellgebundene Infektion in der Zelllinie TTC 243 stammen von LEAKE und Mitarb. (1979) für das Keterah- und Zirqa-Virus.

In Übereinstimmung mit LEAKE und Mitarb. (1979) gelang es uns ebenfalls nicht, das Gelbfieberimpfvirus in der Zeckenzelllinie TTC 243 zu züchten.

Der Nairobi Sheep Disease-Virusstamm 045 konnte in der Zeckenzelllinie TTC 243 von der 3.-34. Passage erfolgreich weitergeführt werden, ohne daß es zu spezifischen zytopathischen Veränderungen kam. Hierbei betrug die Vermehrungsrate insgesamt gegenüber der Ausgangsimpfdosis mindestens 1:100.

Es gelang uns jedoch nicht, infizierte Zellen nach Entfernung des 4. Überstandes zu subkultivieren. Bereits eine Haftung dieser Zellen an der Oberfläche der Kulturgefäße unterblieb. Ob hierbei hauptsächlich eine Schädigung der Zellen durch das Manipulieren beim Mediumwechsel oder doch durch virusbedingte Einflüsse eine Rolle spielten, konnte nicht geklärt werden. In infizierten und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbten Deckglaskulturen konnten keine intrazytoplasmatisch gelegene Einschlusskörperchen nachgewiesen werden, obwohl COACKLEY und PINI (1965) solche erstmals in Warmblüterzellen beschrieben haben. Auch andere Untersucher konnten niemals eine mit Einschlusskörperchenbildung einhergehende Virusvermehrung in Zeckenzellen beobachten.

Während der Passagen in den Zeckenzellen erfuhr der verwendete Nairobi Sheep Disease-Virusstamm anscheinend keine Änderung seiner Virulenz für die Babymaus. Ob eine solche aus unseren Schafversuchen abgeleitet werden kann, muß weiteren Untersuchungen überlassen werden. Es überrascht jedoch, daß die Infektion eines Tieres mit einer hohen Virusdosis der 26. Zellpassage nur von sehr mäßigen klinischen Reaktionen gefolgt war. Nach MUNDERLOH (1977) reagieren allerdings hiesige Merinoschafe nur unregelmäßig und nicht in klassischer Weise auf eine Infektion mit dem Virus der Nairobi Sheep Disease.

Ein ungelöstes Problem bleibt die Frage, inwieweit die Replikation der eingesetzten und nicht zu den Arboviren gehörenden Virusstämme in den Zeckenzellen durch die Bebrütungstemperatur (28°C) beeinflusst wurde. Die von uns geprüften Erreger vermehrten sich im Gegensatz zum Sindbis- und Nairobi Sheep Disease-Virus bei dieser Temperatur nicht. Wir konnten im Rahmen unserer Versuche nicht abklären, ob in den verwendeten Warmblüterzellen bei +28°C eine Vermehrung der getesteten Nicht-Arboviren stattgefunden hätte. Nach den übereinstimmenden Angaben der Literatur (s. bei REHACEK, 1976; LEAKE und Mitarb., 1979) ist anscheinend nur Arboviren eine Vermehrung bei dieser Temperatur möglich. Der umgekehrte Versuch, Nicht-Arboviren

in der Zeckenzelllinie TTC 243 bei $+37^{\circ}\text{C}$ zu züchten, war nicht möglich, da Zeckenzellen bei dieser Temperatur absterben.

Unsere Ergebnisse rechtfertigen erneut die klassische, nach epidemiologisch-ökologischen Gesichtspunkten getroffene Namensgebung und Abgrenzung der Arboviren von den anderen Virusarten. Sie lassen aber eindeutig erkennen, daß Zeckenzellen zur Züchtung von "tick-borne" Viren mit Erfolg verwendet werden können. Weitere Untersuchungen müßten noch klären, ob die Zeckenzelllinie TTC 243 für die Isolierung dieser Viren empfänglicher ist als Warmblüterzellen oder Saugmäuse. Für nicht von Zecken übertragene Arboviren sind Zeckenzellen anscheinend nur ausnahmsweise und nur zu einem gewissen Grade geeignet.

Zusammenfassung

Der Literaturteil der Arbeit umfaßt einen Überblick über die Entwicklung der Zeckengewebekulturtechnik, ihren derzeitigen Stand und die bisherigen Erfahrungen in der Verwendung von Zeckenzellen in der Virusforschung.

Im experimentellen Teil wurden Zuchtungsversuche von folgenden DNS- bzw. RNS-Virusarten in der Zeckenzelllinie TTC 243 beschrieben: Ektromelie-, Hühnerpocken-, Vaccinia-, Orf-, Allerton-, Mammillitis-, Aujeszky-, Infektiöse Bovine Rhinotracheitis-, Bovines Adeno(Typ 3)-, Polio 1-Impf-, Sindbis-, Gelbfieber-, Reo(Typ 3)- und Nairobi Sheep Disease-Virus.

Nur Sindbis- und Nairobi Sheep Disease-Virus konnten in dieser Zelllinie, ohne daß es zu zytopathischen Veränderungen kam, erfolgreich vermehrt werden. Mit Nairobi Sheep Disease-Virus wurden 32 Passagen durchgeführt. Eine Virulenzänderung für Schafe und Saugmäuse trat hierbei nicht auf.

Die Problematik der Haltung von Zeckenzellen und die Vor- und Nachteile ihrer Verwendung für die Viruszüchtung werden diskutiert.

Summary

Tick Tissue Cultures and their Use in Virology

A Review and Experiments to Cultivate RNA- and DNA-Viruses

The first part of this thesis represents a review of the hitherto published literature concerning preparation of tick tissue cultures and their use for virological studies.

The following viruses were tested, if they multiply in the Rhipicephalus appendiculatus cell line TTC 243: Ectromelia-, Fowlpox-, Vaccinia-, Orf-, Allerton-, Mammillitis-, Aujeszky-, Infectious Bovine Rhinotracheitis-, Bovine Adeno(Type 3)-, Polio Vaccine(Type 1)-, Sindbis-, Yellow fever-, Reo(Type 3)- and Nairobi Sheep Disease-Virus.

Only Sindbis- and Nairobi Sheep Disease Virus could be successfully cultivated in the tick cell line TTC 243 but without cytopathogenic effect.

Nairobi Sheep Disease Virus was passaged 32 times. No changes in virulence for sheep and babymice occurred.

The problems of tick tissue cultures, their advantages and disadvantages for virus research are discussed.

Literaturverzeichnis

- BANERJEE, K.
GURU, P.Y.
DHANDA, V. (1977) Growth of arboviruses in cell cultures derived from the tick *Haemaphysalis spinigera*.
Indian J. Med. Res. 66, 530
- BHAT, U.K.M.
YUNKER, C.E. (1977) Establishment And Charakterization Of A Diploid Cell Line From The Tick *Dermacentor Parumapertus* Neumann (Acarina: Ixodidae).
J. Parasitol. 63, 1092
- COACKLEY, W.
PINI, A. (1965) The Effect of Nairobi Sheep Disease Virus on Tissue Culture Systems. J. Path. Bact. 90, 672
- DAUBNEY, R.
HUDSON, J.R. (1931) Nairobi Sheep Disease.
Parasitology 23, 507
- DAVID-WEST, T.S. (1974) Propagation and Plaquing of Dugbe Virus (an Ungrouped Nigerian Arbovirus) in Various Mammalian and Arthropod Cell Lines.
Arch. ges. Virusforsch. 44, 330
- ELBL, A.
ANASTOS, G. (1966) Ixodid Ticks of Central Africa. Vo. III
Verlag: Musée Royal de L'Afrique Centrale - Tervuren, Belgique
- GURU, P.Y.
DHANDA, V.
GUPTA, N.P. (1976) Cell Cultures Derived from the Developing Adults of Three Species of Ticks by a Simplified Technique.
Indian J. Med. Res. 64, 1041
- HOFFMANN, G.
KÖHLER, G. (1968) Haltung von Zeckengewebe in künstlichen Nährmedien. Z. Parasitenk. 31, 8
- HOFFMANN, G.
SCHEIN, E.
JAGOW, M. (1970) Untersuchungen an extirpierten und in der Kultur gehaltenen Zeckengewebe.
Zschr. Tropenmed. Parasitol. 21, 46
- HINK, F. (1979) The 1979 Compilation of Invertebrate Cell Lines and Culture Media. (Pers. Mitt.)
- LEAKE, C.J.
PUDNEY, M.
VARMA, M.G.R. (1979) Vortrag 5th Internat. Conf. on Invertebrate Tissue Culture, Rigi-Kaltbad, April 1979

- LEIBOVITZ, A. (1963) A medium for the growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am. J. Hyg.* 78, 173
- MARTIN, H.M.
VIDLER, B.O. (1962) In vitro growth of tick tissues (*Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901). *Exp. Parasit.* 12, 192
- MEDVEDEVA, G.J.
BESKINA, S.R.
GROKHOVSKAYA, J.M. (1972) Culture of ixodid tick embryonic cells. *Med. Parasitol. Moscow* 41, 39
- MONTGOMERY, R.E. (1917) On a Tick-Borne Gastro-Enteritis of Sheep and Goats Occuring in British East Africa. *J. Comp. Path. Ther.* 30, 28
- MUNDERLOH, U. (1977) Die Nairobi Sheep Disease - Eine synoptische Darstellung der Erkrankung sowie Untersuchungen zum Verhalten des Erregers in vivo und in vitro. *Vet. Med. Diss.*, München
- MUSSGAY, M.
ENZMANN, P.J.
HORZINEK, M.C.
WEILAND, E. (1975) Growth cycle of Arboviruses in vertebrate and arthropod Cells. *Progr. med. Virol.* 19, 257
- PUDNEY, M. (1973) Cell cultures of tissues from arthropods and lower vertebrates for application in the study of arboviruses. Ph. D. thesis, Univ. London
- PUDNEY, M.
VARMA, M.G.R.
LEAKE, C.J. (1973) Culture of embryonic cells from the tick *Boophilus microplus* (Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 10, 493
- PUDNEY, M.
VARMA, M.G.R.
LEAKE, C.J. (1978) The Growth of some Arboviruses in Tick Cell Lines. In: *Tick-borne Diseases and their Vectors*. Ed. J.K.H. Wilde, Univ. Edinburgh, p. 490
- REHACEK, J. (1958) Preliminary report on tick tissue culture. *Acta virol.* 2, 253
- REHACEK, J. (1962) An improved method of tick tissue cultures. *Acta virol.* 6, 188

- REHACEK, J. (1963) Propagation of tick-borne encephalitis (T.E.) virus in tick tissue cultures. Ann. Epiphyties 14, 199
- REHACEK, J. (1965 a) Relation between viruses and tick tissues in vitro. Proc. XII. Int. Congr. Ent., London, p.774
- REHACEK, J. (1965 b) Cultivation of different viruses in tick tissue cultures. Acta virol. 9, 332
- REHACEK, J. (1965 c) Preparation of tissue cultures from the tick Hyalomma dromedarii Koch. J. Med. Entomol. 2, 161
- REHACEK, J. (1971) Present Status of tick tissue culture. In: Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55, 32. Ed. E. Weiss, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- REHACEK, J. (1972) Use of Invertebrate Cell Culture for Study of Animal Viruses and Rickettsiae. In: Invertebrate Tissue Culture 2, 279. Ed. C. Vago, Acad. Press, New York, San Francisco, London
- REHACEK, J. (1976) Tick Tissue Culture And Arboviruses. In: Invertebrate Tissue Culture. Ed. K. Maramorosch, E. Kurstak, S. 21 Acad. Press, New York, San Francisco, London
- REHACEK, J.
BRZOSTOWSKI, H.W. (1969 a) A tick tissue culture medium based on analyses of tick haemolymph. J. Insect. Physiol. 15, 1431
- REHACEK, J.
BRZOSTOWSKI, H.W. (1969 b) The utilization of amino acids and sugars by tick cells cultivated in vitro. J. Insect. Physiol. 15, 1683
- REHACEK, J.
KOZUCH, O. (1964) Comparison of the susceptibility of primary tick and chick embryo cell cultures to small amounts of tick-borne encephalitis virus. Acta virol. 8, 470

- REHACEK, J.
KOZUCH, O. (1969) The use of *Hyalomma dromedarii* tick tissue cultures for the isolation of tick-borne encephalitis virus from its natural foci. *Acta virol.* 13, 253
- REHACEK, J.
PESEK, J. (1960) Propagation of eastern equine encephalomyelitis (E.E.E.) virus in surviving tick tissues. *Acta virol.* 4, 241
- REHACEK, J.
RAJCANI, J.
GRESIKOVA, M. (1969) Relationship Of Tribec Virus To Tick Cells And Tissues. *Acta virol.* 13, 439
- VAGO, C.
CHASTANG, S. (1960) Culture de Borrelinavirus dans les organes d'insectes en survie. *C.R. Acad. Sci.* 251, 903
- VARMA, M.G.R.
PUDNEY, M. (1973) Culture of cells from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* Ixodoidea: Ixodidae. *Proc. 3rd Int. Coll. Invert. Tissue Cult. Smolenice* (1971), p. 135
- VARMA, M.G.R.
PUDNEY, M.
LEAKE, C.J. (1975) The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae) and their infection with some arboviruses. *J. med. Ent.* 11, 698
- VARMA, M.G.R.
WALLERS, W. (1965) An Improved Method for Obtaining in vitro Uniform Cell Monolayer Sheets from Tissues of the Tick *Hyalomma dromedarii* (Ixodidae). *Nature* 208, 602
- YUNKER, C.E.
CORY, J. (1967) Growth of Colorado tick fever (CTF) virus in primary tissue cultures of its vector *Dermacentor andersoni* Stiles (Acarina: Ixodidae), with notes on tick tissue culture. *Exp. Parasitol.* 20, 267

Bei Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch bedanke ich mich
für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Für die Übergabe des Themas, die wissenschaftliche Beratung
und die freundliche Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung
meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Professor
Dr. E. Munz.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn M. Reimann für
seine große Geduld und Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 15.4.1953 wurde ich in Mering als Tochter des Abteilungsleiters Norbert Settele und seiner Ehefrau Christine, geb. Rabenstein, geboren.

Nach einer 5-jährigen Grundschulzeit (1959-1964) in Kissing besuchte ich 9 Jahre lang das neusprachliche Maria Ward-Gymnasium in Augsburg. Das Abitur legte ich im Juni 1973 ab.

Am 15. Oktober des gleichen Jahres begann ich das Studium der Tiermedizin in München, das ich dort im Oktober 1978 mit dem Staatsexamen abschloß. Meine Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 7.2.1979.

Von Oktober 1978 bis November 1979 fertigte ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München meine Dissertation an.

